



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 6 : <b>C12N 9/64, C07K 14/745</b></p>	<p><b>A1</b></p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/47737</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>18. Dezember 1997 (18.12.97)</b></p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP97/03027</b></p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: <b>11. Juni 1997 (11.06.97)</b></p> <p>(30) Prioritätsdaten:            96109288.9      11. Juni 1996 (11.06.96)      EP            (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:      DE usw.            96110109.4      22. Juni 1996 (22.06.96)      EP            (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:      DE usw.            96110959.2      6. Juli 1996 (06.07.96)      EP            (34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist:      DE usw.</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE).</b></p> <p>(72) Erfinder; und            (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>KOPETZKI, Erhard [DE/DE]; Kastnerhofstrasse 21, D-82377 Penzberg (DE).</b></p>		<p>HOPFNER, Karl-Peter [DE/DE]; Neumarkter Strasse 86B, D-81673 München (DE).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: <b>BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; Werk Penzberg, Abt. RE-TB (Patentabteilung), Postfach 11 52, D-82372 Penzberg (DE).</b></p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>

(54) Title: **RECOMBINANT BLOOD-COAGULATION PROTEASES**

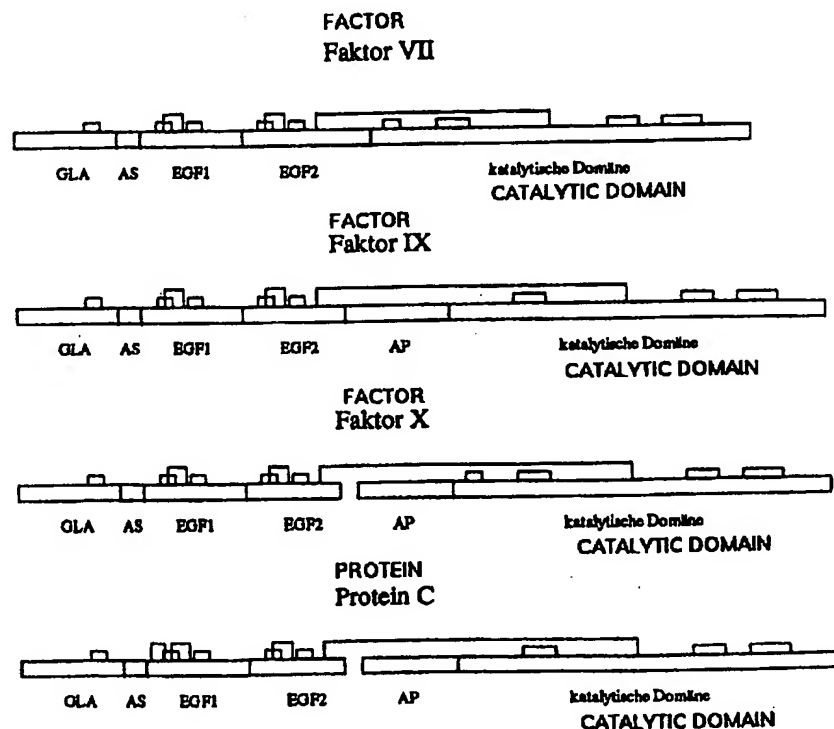
(54) Bezeichnung: **REKOMBINANTE BLUTGERINNUNGSPROTEASEN**

(57) Abstract

The invention relates to a non-glycosylated protein with enzymatic and serin protease activity, the zymogenous form thereof comprising the following domains of a protease of the factor IX family: (a) a catalytic domain, N-terminal bonded with (b) a zymogenous activation domain, N terminal bonded with (c) a EGF1 and/or EGF2 domain. Said protein can be used in a same way as the natural serine proteases of the factor IX family.

(57) Zusammenfassung

Ein nicht glycosyliertes enzymatisch aktives Protein mit Serinproteaseaktivität und dessen zymogene Form bestehend aus den folgenden Domänen einer Protease der Faktor-IX-Familie: a) der katalytischen Domäne, N-terminal verbunden mit b) einer Zymogen-Aktivierungsdomäne, N-terminal verbunden mit c) einer EGF1 und/oder EGF2 Domäne, ist in analoger Weise wie die natürlichen Serinproteasen der Faktor-IX-Familie verwendbar.



# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Rekombinante Blutgerinnungsproteasen

Gegenstand der Erfindung sind verkürzte posttranslational nicht modifizierte Blutplasma-proteasevarianten der Faktor IX Genfamilie (FVII, FIX, FX und Protein C) bestehend aus EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid (AP) und katalytischer Domäne (CD) sowie Verfahren zu ihrer Herstellung durch Expression in einer Wirtszelle, vorzugsweise in einem Mikroorganismus, Naturierung in vitro und anschließende Aktivierung mit einer geeigneten Protease.

Die erfindungsgemäßen Blutplasma-proteasevarianten sind geeignet zum Auffinden (Sreening) von Inhibitoren, zur Herstellung von Co-Kristallen aus Proteasevariante und Inhibitor zwecks Röntgenstrukturanalyse und "drug modelling" und als diagnostische Testkomponente in Aktivator-tests.

Blutplasma-proteasen spielen sowohl eine Rolle bei der Blutgerinnung, dem Wundverschluß durch Fibrinbildung als auch bei der Fibrinolyse, der Clotauflösung bei der Wundheilung. Nach einer Verletzung wird durch sequentielle Aktivierung (spezifische Proteolyse) von inaktiven Proenzymen zu aktiven Enzymen das "Verletzungssignal" amplifiziert, wodurch die Blutgerinnung eingeleitet und ein schneller Wundverschluß gewährleistet wird. Die Blutgerinnung kann über zwei Wege initiiert werden, dem intrinsischen Weg, bei dem alle Proteinkomponenten im Blut vorhanden sind, und dem extrinsischen Weg, bei dem ein Membranprotein, der sogenannte "tissue factor", eine kritische Rolle spielt.

Der molekulare Mechanismus der Bluthomöostase (Blutgerinnung, Fibrinolyse und die Regulation dieses Gleichgewichts) und der daran beteiligten Komponenten ist in einigen Übersichtsartikeln umfassend dargestellt worden (Furie, B. und Furie, B.C., Cell 53 (1988) 505-518; Davie, E.W. et al. Biochem. 30 (1991) 10363-10379; Bergmeyer, H.U. (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V, chapter 3, 3rd ed., Academic Press, New York (1983)).

Die Proteasen der Blutgerinnungskaskade sind sehr komplexe Proteine. Sie können in der Regel nur mit großem Aufwand in begrenzter Menge, mit schwankender Qualität, Homogenität und Reinheit aus der natürlichen Rohstoffquelle, dem Blutplasma, isoliert werden (Van Dam-Mieras, M.C.E. et al., In: Bergmeyer, H.U. (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V, 3rd ed., page 365-394, Academic Press, New York (1983)). Sie sind wesentlich an der

Regulation der Bluthomöostase beteiligt, dem Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung, Clotbildung und Auflösung. Dieses gut regulierte System kann sowohl durch genetisch bedingte Defekte, wie z.B. der Hämophilie A (defekter Faktor VIII) und Hämophilie B (defekter Faktor IX), als auch durch akute Störungen aus dem Gleichgewicht geraten, wie z.B. beim Herzinfarkt, der Embolie und dem Gehirnschlag.

Es besteht deshalb ein Bedarf an Substanzen, mit denen das System der Blutgerinnung und Fibrinolyse je nach medizinischer Notwendigkeit beeinflusst werden kann. Z.B. wird zur Behandlung der Hämophilie A und B rekombinant hergestellter Faktor VIII bzw. Faktor IX oder seit kurzem auch Faktor VII verwendet. Zur Clotauflösung, z.B. nach Herzinfarkt, findet tPA ("tissue type plasminogen activator") und Streptokinase (bakterielle Protease) Anwendung. Neben komplexen Proteinen werden auch Substanzen, wie z.B. Hirudin (Peptid aus 65 Aminosäuren, Thrombininhibitor), Heparin (Heteroglykan, Thrombininhibition / Cofaktor) und Vitamin-K Antagonisten (Inhibitoren der  $\gamma$ -Carboxylierung; Glu-Reste der GLA-Domäne), zur Hemmung der Blutgerinnung verwendet. Die verfügbaren Substanzen sind jedoch oft noch sehr teuer (Proteinfaktoren) und hinsichtlich ihrer medizinischen Anwendung nicht ideal (Nebenwirkungen), so daß ein Bedarf an Medikamenten besteht, mit dem die Blutgerinnung und Clotauflösung spezifischer moduliert werden kann.

Die Suche nach neuen Modulatoren (Aktivatoren, Inhibitoren) der Blutgerinnung, Fibrinolyse und Homöostase kann z.B. durch Screening von Substanzbibliotheken und anschließende Verbesserung einer identifizierten Leitstruktur durch "drug modelling" erfolgen. Dazu ist es notwendig, daß das (die) Schlüsselprotein(e) [Target(s)] in ausreichender Menge und Qualität für ein Screening und für Kristallisationsuntersuchungen (z.B. Verbesserung der Leitstruktur durch gezielte Vorhersage von Veränderungen anhand der 3D-Struktur aus Proteinkomponente und Leitstruktur) zur Verfügung stehen.

Attraktive Targets innerhalb der Homöostase stellen z.B. die aktivierten Serinproteasen Thrombin, FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa, Kallikrein (Blutgerinnung), tPA, Urokinase, Plasmin (Fibrinolyse) und aktiviertes Protein C (regulatorischer Antikoagulant) und deren inaktive Vorstufen (Zymogene) dar.

Die Isolierung der inaktiven Serinproteasen (Zymogene) aus Blutplasma und die anschließende Aktivierung durch Proteolyse ist schwierig, aufwendig, teuer und liefert oft nicht die z.B. für Kristallisationsexperimente gewünschte Menge und Qualität. Z.B. beträgt die Plasmakonzentration für die inaktiven Proteasezymogene FX, FIX und FVII nur 10, 5, beziehungsweise

0,5 mg/l (Furie, B. und Furie, B.C., Cell 53 (1988) 505-518). Zudem sind die aus dem Plasma isolierten und in vitro aktivierten Proteasepräparationen oft sehr heterogen und instabil. Außerdem erschweren nicht einheitliche posttranslationale Modifizierungen (z.B. Kohlenhydratgruppen) Kristallisationsexperimente.

Blutplasmaproteasen sind komplexe Glycoproteine, die zur Familie der Serinproteasen gehören. Sie werden in der Leber als inaktive Proenzyme (Zymogene) synthetisiert, ins Blut sezerniert und bei Bedarf durch spezifische Proteolyse, d.h. durch Spaltung von ein oder zwei Peptidbindungen, aktiviert. Sie sind strukturell hinsichtlich der Proteindomänenanordnung und Zusammensetzung sehr ähnlich (Furie, B. und Furie, B.C., Cell 53 (1988) 505-518).

Die Proteasen der Faktor IX Familie (Faktor VII, IX, X, und Protein C) bestehen gemäß Furie, B. und Furie, B.C. aus

- einem Propeptid,
- einer GLA-Domäne,
- einer "aromatic amino acid stack" Domäne,
- zwei EGF-Domänen (EGF1 und EGF2),
- einer Zymogen Aktivierungsdomäne (Aktivierungspeptid, AP) und
- einer katalytischen Proteasedomäne (CD).

Zudem werden die Blutplasmaproteasen während der Sekretion posttranslational modifiziert:

- 11 - 12 Disulfidbrücken
- N- und/oder O-Glycosylierung (GLA-Domäne und Aktivierungspeptid)
  - Bharadwaj, D. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 6537-6542
  - Medved, L.V. et al., J. Biol. Chem. 270 (1995) 13652-13659
- Abspaltung des Propeptides
- $\gamma$ -Carboxylierung von Glu-Resten (GLA-Domäne)
- $\beta$ -Hydroxylierung eines Asp-Restes (EGF-Domänen)
- Spaltung der Zymogenregion (teilweise).

Nach Aktivierung der Zymogene (zymogene Form des Proteins) durch spezifische Spaltung von ein oder zwei Peptidbindungen (Aktivierungspeptid) bestehen die enzymatisch aktiven Proteasen aus zwei Ketten, die entsprechend ihrem Molekulargewicht mit schwerer und leichter Kette bezeichnet werden. Die beiden Ketten werden in der Faktor IX Proteasefamilie

durch eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen der EGF2-Domäne und der Proteasedomäne zusammengehalten. Die Zymogen-Enzym Transformation (Aktivierung) führt zu Konformationsänderungen innerhalb der Proteasedomäne. Dadurch kann sich eine für die Proteaseaktivität notwendige essentielle Salzbrücke zwischen der N-terminalen Aminosäure der Proteasedomäne und einem Asp-Rest innerhalb der Proteasedomäne ausbilden. Für diese Untergruppe von Serinproteasen ist der N-terminale Bereich sehr kritisch und darf nicht modifiziert werden. Nur dann kann sich die für Serinproteasen typische "active site" mit der katalytischen Triade aus Ser, Asp und His ausbilden (Blow, D.M.: Acc. Chem. Res. 9 (1976) 145-152; Polgar, L.: In: Mechanisms of protease action. Boca Raton, Florida, CRC Press, chapter 3 (1989).

Blutplasma-proteasen können klassisch durch Isolierung der inaktiven Zymogene aus dem Blut und anschließende Aktivierung oder rekombinant durch Expresssion der entsprechenden cDNA in einer geeigneten Säugetier-Zelllinie oder Hefe hergestellt werden.

**Herstellung von Blutplasma-proteasen durch Expression / Sekretion der Zymogene bzw. aktiven Proteasen mittels eukaryontischer Wirts-/ Vektorsysteme:**

**FVII:** Hagen, F.S. et al., EPS 0200421; **Pedersen, A.H. et al.,** Biochem. 28 (1989) 9391-9336; **FIX:** Lin, S.-W. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 144-150; **FX:** Wolf, D.L. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 13726-13730; **Protein C:** Bang, N.U. et al., EPS 0191606.

In der Regel werden Wirtszellen verwendet, die in der Lage sind, die Blutplasma-proteasen während des Sekretionsprozesses entsprechend dem nativen Enzym posttranslational zu modifizieren. Die Zymogen-Enzym Transformation erfolgt dann nachträglich während der "down stream" Prozessierung, wie z.B. im Falle von Prothrombin oder Faktor X mit einem Aktivator aus Schlangengift (Sheehan, J.P. et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 3639-3645; Fujikawa, K. et al., Biochem. 11 (1972) 4892-4898).

Zwecks Zymogen-Enzym Aktivierung in vivo (bereits während der Sekretion) wurden die natürlichen Zymogenschnittstellen bzw. das gesamte Aktivierungspeptid gegen Proteaseschnittstellen ausgetauscht (mehrere benachbarte basische Aminosäuren), die von im Sekretionsweg der Wirtszelle natürlich vorkommenden spezifisch spaltenden Proteasen wie z.B. Kex2 (Hefe) oder PACE (Säugetier Zelllinien) gespalten werden können (**FX:** Wolf, D.L. et al., J. Biol. Chem. 266 (1991) 13726-13730; **Prothrombin:** Holly, R.D. und Foster, D.C., WO 93/13208).

Auch die Herstellung von Proteasevarianten (FX: Rezaie, A.R. et al., J. Biol. Chem. 268 (1993) 8176-8180; FIX: Zhong, D.G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 3574-3578), Mutanten (FX: Rezaie, A.R. et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 21495-21499; Thrombin: Yee, J. et al., J. Biol. Chem. 269 (1994) 17965-17970; FVII: Nicolaisen, E.M. et al., WO 88/10295) und Chimären z.B. aus FIX und FX (Lin, S.-W. et al., J. Biol. Chem. 265 (1990) 144-150; Hertzberg, M.S. et al., J. Biol. Chem. 267 (1992) 14759-14766) mittels eukaryontischer Wirts-/ Vektorsysteme ist bekannt.

Nachteile der Expression in eukaryontischen Säugetier Zelllinien:

- aufwendig
- limitierend hinsichtlich der Expressionsleistung
- teuer
- posttranslationale Modifikationen

**Herstellung von Blutplasma proteasen durch Expression in Prokaryonten und anschließende Naturierung des Expressionsprodukts:**

Thogersen, H.C. et al. (WO 94/18227) beschreiben die Naturierung von FX Varianten mittels eines zyklischen Naturierungsprozesses, bei dem das inaktive FX Protein mittels eines Metallchelatkompleses ("poly(His)-affinity handle") in einer Chromatographiesäule fixiert ist.

Dazu wurde ein Fusionsprotein verwendet bestehend aus einer verkürzten FX Variante (EGF1, EGF2 und Proteasedomäne), einer zusätzlichen FXa Proteaseerkennungssequenz und einer aus 6 Histidin-Resten bestehenden Fixierungshilfe am C-Terminus der katalytischen Domäne.

Nachteile:

- Ein Fusionsprotein aus Protease und Poly-His Fixierungshilfe muß konstruiert werden.
- Der Naturierungsprozeß ist sehr aufwendig.
  - Viele Naturierungszyklen sind notwendig.
  - komplexe Apparatur
  - Die Ausbeute beträgt nur 10%.
- Die Fixierungshilfe muß ggf. nach der Naturierung entfernt werden.

- 6 -

- Durch Autokatalyse wird nur der Poly-His Schwanz, nicht aber die zusätzlich eingeführte FXa Spaltstelle entfernt.

DiBella, E.E. et al. (J. Biol. Chem. 270 (1995) 163-169) beschreiben die Naturierung einer verkürzten Thrombinvariante (Prethrombin-2) aus A-Kette (49 Aminosäuren) und B-Kette (259 Aminosäuren).

Eine analoge Faktor Xa Variante bestehend aus Aktivierungspeptid und Proteasedomäne (siehe Beispiel 4) läßt sich jedoch nicht naturieren. Neben der Zymogenregion (Aktivierungspeptid aus ca. 50 Aminosäuren) ist zur FXa Naturierung die EGF2-Domäne erforderlich. Das gilt für alle Mitglieder der FIX Proteinfamilie (FVII, FIX, FX und Protein C).

Thrombin gehört nicht zur FIX Genfamilie und besitzt anstelle von zwei EGF-Domänen zwei Kringel- Domänen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß enzymatisch aktive Proteine mit Serinproteaseaktivität durch Expression einer entsprechenden DNA in Prokaryonten, Naturierung des Expressionsprodukts und enzymatische Spaltung herstellbar sind, wenn sie zusammengesetzt sind aus Serinproteasedomäne (katalytische Domäne), N-terminal verbunden mit einer Zymogenaktivierungsdomäne und einer EGF-Domäne (EGF1 und/oder EGF2).

Die erfindungsgemäßen aktiven und verkürzten Serinproteasen der Faktor IX Familie sind hinsichtlich ihrer Spezifität unverändert (identisch) und können demzufolge sowohl in Aktivitätstests als auch im Screening nach neuen Modulatoren (Aktivatoren, Inhibitoren) verwendet werden.

Es war nicht möglich, durch Expression einer nur für die katalytische Domäne codierenden DNA und Naturierung des inaktiven Expressionsprodukts eine enzymatisch aktive Proteasedomäne herzustellen.

Auch durch N-terminale Proteasedomäne-Fusionsproteine mit selektiver Proteaseschnittstelle (z.B. Enterokinase-Spaltstelle) konnten die gewünschten enzymatisch aktiven Proteasedomänen von z.B. FIXa und FXa nicht hergestellt werden. Die Expressionsprodukte waren gemäß dem Stand der Technik nicht naturierbar.



Gegenstand der Erfindung ist ein nicht glycosyliertes, enzymatisch aktives Protein mit Serinproteaseaktivität und dessen zymogene Vorläufer-Form bestehend aus den folgenden Domänen einer Protease aus der Faktor IX Familie:

- a) der katalytischen Domäne, N-terminal verbunden mit
- b) einer Zymogenaktivierungsdomäne (Aktivierungspeptid), N-terminal verbunden mit
- c) einer EGF1- und/oder EGF2-Domäne (vorzugsweise EGF2 oder EGF1 und EGF2).

Vorzugsweise besteht die Zymogenaktivierungsdomäne aus einem Oligopeptid mit bis zu 50 Aminosäuren. Nach Spaltung der erfindungsgemäßen zymogenen (inaktiven) einkettigen Form in der Zymogenaktivierungsdomäne entsteht eine zweikettige aktive Protease. In der zweikettigen Form sind die beiden Ketten durch eine intermolekulare Disulfidbrücke (interchain) verbunden (Fig. 1 und Fig. 2).

Vorzugsweise bestehen die erfindungsgemäßen Proteine aus der EGF2-Domäne der Zymogenaktivierungsdomäne und der katalytischen Domäne von Faktor X und/oder Faktor IX. Bevorzugt ist ebenfalls ein Protein, welches aus der EGF2-Domäne und der katalytischen Domäne von Faktor X sowie dem Aktivierungspeptid von Faktor IX besteht. Besonders bevorzugt ist ein Protein, welches aus dem N-terminalen Teil der Faktor X EGF2-Domäne (Aminosäureposition 108-154, Fig. 3), dem C-terminalen Teil der Faktor IX EGF2-Domäne, dem Faktor IX Aktivierungspeptid und der Faktor IX N-terminalen Halbseite (Aminosäureposition 133-289, Fig. 4) und der Faktor X C-terminalen Halbseite (Aminosäureposition 322-454, Fig. 3) zusammengesetzt ist.

Die erfindungsgemäßen Zymogene und aktiven Proteasen der Faktor IX Familie können anstelle der natürlichen Zymogene und Proteasen verwendet werden. Zweckmäßige Verwendungsmöglichkeiten sind beispielsweise in der Biotechnologie der Einsatz als Restriktionsprotease (vorzugsweise Faktor Xa), in der Diagnostik als Bestandteil einer enzymatischen Bestimmungsmethode, insbesondere zur indirekten Bestimmung von Blutgerinnungsproteaseaktivitäten (vorzugsweise Faktor IXa-Bestimmung). Eine weitere Verwendungsmöglichkeit ergibt sich als Target in Screening-Assays zur Suche nach Modulatoren (Aktivatoren, Inhibitoren) der Blutgerinnung, Fibrinolyse oder Homöostase. Schließlich stehen mit den erfindungsgemäßen Proteinen kristallisierbare Serinproteasen zur Verfügung, die vorteilhaft für Kristallisationsuntersuchungen (vorzugsweise Cokristallisation mit Aktivatoren und Inhibitoren) eingesetzt werden können.

Besonders bevorzugt werden die erfindungsgemäßen aktiven Proteasen der Faktor IX Familie (Faktor IXa, Faktor Xa, Faktor VIIa und Protein C) zur Identifikation von Inhibitoren verwendet. Ganz besonders bevorzugt ist hierbei die direkte Bestimmung von Faktor IXa und die Identifikation von Faktor IXa Hemmstoffen. Weiterhin können die erfindungsgemäßen Zymogene als Einsatzstoffe in einem diagnostischen Test verwendet werden. Dabei wird das erfindungsgemäße Zymogen (z.B. Faktor X) durch die zu bestimmende Protease (z.B. Faktor IXa) aktiviert. Das aktivierte Zymogen (z.B. Faktor Xa) spaltet dann ein chromogenes Peptidsubstrat (z.B. Chromozym X) und generiert ein Meßsignal (z.B. p-Nitroanilin). Die hierdurch entstandene Farbänderung ist ein Maß für die Konzentration von Faktor IXa in der Probe und ist proportional zur zu bestimmenden Proteaseaktivität.

Vorzugsweise ist zwischen der Zymogenaktivierungsdomäne und der EGF-Domäne (oder den EGF-Domänen) ein Spacer mit bis zu 50 Aminosäuren eingefügt. Bei der Spaltung der erfindungsgemäßen zymogenen einkettigen Form in der Zymogenaktivierungsdomäne wird ein aktives Protein in einer zweikettigen Form erhalten. In der zweikettigen Form sind beide Ketten durch eine intermolekulare Disulfidbrücke verbunden (Fig. 1 und Fig. 2).

Vorzugsweise bestehen die erfindungsgemäßen Proteine aus der EGF2-Domäne, dem Aktivierungspeptid und der katalytischen Domäne von Faktor X und/oder Faktor IX. Bevorzugt ist ebenfalls ein Protein, welches aus der EGF2-Domäne und der katalytischen Domäne von Faktor X sowie der Aktivierungsdomäne von Faktor IX besteht.

## **Methoden**

### **Rekombinante DNA-Technik**

Zur Manipulation von DNA wurden Standardmethoden benutzt, wie sie bei Sambrook, J. et al. (1989) In: Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind. Die verwendeten molekularbiologischen Reagenzien wurden nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

### **Proteinbestimmung**

Die Proteinkonzentration der Proteasevarianten wurde durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm unter Verwendung des anhand der Aminosäuresequenz errechneten molaren Extinktionskoeffizienten ermittelt.

### Expressionsvektor

Der Vektor zur Expression der Blutgerinnungsproteasevarianten basiert auf dem Expressionsvektor pSAM-CORE für core-Streptavidin. Die Herstellung und Beschreibung des Plasmids pSAM-CORE ist in der WO 93/09144 von Kopetzki, E. et al. beschrieben.

Das core-Streptavidin Gen wurde durch das gewünschte Proteasevariantengen im pSAM-CORE Vektor ersetzt.

Die folgenden Beispiele, Publikationen, das Sequenzprotokoll und die Abbildungen erläutern die Erfindung, deren Schutzzumfang sich aus den Patentansprüchen ergibt, weiter. Die beschriebenen Verfahren sind als Beispiele zu verstehen, die auch noch nach Modifikationen den Gegenstand der Erfindung beschreiben.

### **Beschreibung der Figuren**

- Fig. 1 ist eine schematische Darstellung der Blutplasma-Proteasen der FIX Proteasefamilie.
- Fig. 2 ist eine schematische Darstellung der konstruierten verkürzten FIX, FX und FIX/X chimären Blutplasma-Proteasen.  
(Bei rFIX/X-EGF2-AP-CD ist der Faktor X-Teil weiß und der Faktor IX-Teil schwarz.)  
Abkürzungen: AP = Aktivierungspeptid; AS = "aromatic amino acid stack" Domäne; CD = katalytische Domäne; EGF1 = epidermale-Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne 1; EGF2 = epidermale-Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne 2; GLA =  $\gamma$ -carboxyglutaminsäurereiche Domäne.
- Fig. 3 zeigt die für FX bei Kaul, R.K. et al. (Gene 41 (1986) 311-314) angegebene Nukleotid- und Aminosäuresequenz. (Die Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO:15 gezeigt.)
- Fig. 4 zeigt die für FIX bei McGraw, R.A. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 2847-2851) angegebene Nukleotid- und Aminosäuresequenz. (Die Nukleotidsequenz ist in SEQ ID NO:16 gezeigt.)

**Beispiel 1****Klonierung der katalytischen Domäne des FX Proteasegens****(Plasmid: pFX-CD)**

Die FX cDNA von Bp-Position 649-1362, kodierend für die FX Proteasedomäne von Aminosäureposition 217-454 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend der Publikation von Kaul, R.K. et al. (Gene 41 (1986) 311-314; Fig. 3) wurde in einer "Polymerase Chain Reaktion" (PCR) gemäß der Methode von Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (Methods Enzymol. 155, (1987) 355-350) unter Verwendung der PCR Primer N1 (SEQ ID NO: 1) und N2 (SEQ ID NO: 2)

EcoRI BspHI

N1: 5'-AAAAAAGAATTCTCATGATCGTGGGAGGCCAGGAATGCAAG-3'  
MetIleValGlyGlyGlnGluCysLys

HindIII

N2: 5'-AAAAAAAGCTTCATTACTTGGCCTTGGGCAAGCCCCTGGT-3'

und einer kommerziell erhältlichen humanen Leber cDNA Genbank (Vektor: Lamba ZAP® II) der Firma Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.) als Template DNA amplifiziert. Mittels der PCR Primer wurde am 5'-Ende der kodierenden Region eine singuläre BspHI Schnittstelle und ein ATG-Startkodon und am 3'-Ende der kodierenden Region eine singuläre HindIII Schnittstelle eingeführt.

Das ca. 740 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen BspHI und HindIII verdaut und das ca. 725 Bp lange BspHI/HindIII-FX Fragment nach Reinigung durch Agarosegelelektrophorese in das ca. 2,55 kbp lange NcoI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment ligiert. Das gewünschte Plasmid pFX-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR isolierte FX cDNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

**Beispiel 2****Konstruktion des FX Proteasegens mit N-terminalem (His)<sub>4</sub>-Schwanz, Enterokinase-spaltstelle und katalytischer Domäne (Plasmid: pFX-EK-CD)**

Der Leserahmen des klonierten FX-CD Gens (siehe Beispiel 1) wurde am 5'-Ende mit einer Nukleotidsequenz verbunden, die für die Aminosäuresequenz MHHHHDDDDK (SEQ ID NO:17) kodiert und das ATG-Startkodon, eine Poly-His-Sequenz und eine Enterokinasespalt-

- 11 -

stelle enthält. Zur Konstruktion dieses FX-EK-CD Variantengens wurde die am 5'-Ende des FX-CD Gens lokalisierte singuläre BsmI Schnittstelle und die stromaufwärts im Promotor benachbarte singuläre EcoRI Schnittstelle verwendet.

Dazu wurde das Plasmid pFX-CD mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BsmI verdaut und das ca. 3,25 kbp lange EcoRI/BsmI-pFX-CD Vektorfragment nach Isolierung mittels Agarosegelelektrophorese mit dem FX-EK-CD DNA-Adaptor ligiert. Der FX-EK-CD Adaptor wurde durch Hybridisierung aus den komplementären Oligonukleotiden N3 (SEQ ID NO: 3) und N4 (SEQ ID NO: 4) (Reaktionspuffer: 12,5 mmol/l Tris-HCl, pH 7,0 und 12,5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>; N Konzentration: jeweils 1 pmol / 60 µl) hergestellt.

#### FX-EK-CD Adaptor:

N3: 5'-AATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAATGCATCACCACCACGACGATGACGACAAGATCGTGGGAGGCCAGGAATGCA-3'

N4: 5'-CATTCCTGGCCTCCACGATCTTGTCGTCATCGTCGTGGTGGTGATGCATTTTAATTTCTCCTCTTTAATG-3'

	EcoRI		BsmI
N3:	5'-	<u>AATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAATGCATCACCACCACGACGATGACGACAAGATCGTGGGAGGCCAGGAATGCA</u>	-3'
N4:	3'-	<u>GTAATTTCTCCTCTTTAATTTTACGTAGTGGTGGTCTGCTACTGCTGTTCTAGCACCCCTCCGGTCCCTTAC</u>	-5'
		MetHisHisHisHisAspAspAspAspLysIleValGlyGlyGlnGluCys	

#### Beispiel 3

Klonierung des FX Proteasogens mit EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid und katalytischer Domäne (Plasmid: pFX-EGF2-AP-CD)

Die FX cDNA von Bp-Position 322-1362, kodierend für die EGF2-Domäne, das Aktivierungspeptid und die katalytische Proteasedomäne von Aminosäureposition 108-454 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend Fig. 3) wurde mittels PCR unter Verwendung der PCR Primer N5 (SEQ ID NO: 5) und N2 (SEQ ID NO: 2)

	EcoRI
N5:	5'-AAAAAG <u>AATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAATGCGGAAGCTCTGCAGCCTGGACAAC</u> -3'
	MetArgLysLeuCysSerLeuAspAsn

und einer kommerziell erhältlichen humanen Leber cDNA Genbank (Vektor: Lamba ZAP<sup>®</sup> II) der Firma Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.) als Template DNA amplifiziert. Mittels der PCR Primer wurde am 5'-Ende der kodierenden Region ein ATG-Startkodon und eine singuläre

- 12 -

EcoRI Schnittstelle und am 3'-Ende der kodierenden Region eine singuläre HindIII Schnittstelle eingeführt.

Das ca. 1,09 kbp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BstEII verdaut und das ca. 1,02 kbp lange EcoRI/BstEII-FX Fragment nach Reinigung durch Agarosegelelektrophorese in das ca. 2,58 kbp lange EcoRI/BstEII-pFX-CD Vektorfragment (Beispiel 1) ligiert. Das gewünschte Plasmid pFX-EGF2-AP-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR isolierte FX cDNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

#### Beispiel 4

**Konstruktion des FX Proteasogens mit verkürzter EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid und katalytischer Domäne (Plasmid: pFX-ΔEGF2-AP-CD)**

Die FX cDNA von Bp-Position 460-1362, kodierend für eine verkürzte EGF2-Domäne, das Aktivierungspeptid und die katalytische Proteasedomäne von Aminosäureposition 154-454 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend Fig. 3) wurde mittels PCR unter Verwendung der PCR Primer N6 (SEQ ID NO: 6) und N2 (SEQ ID NO: 2)

EcoRI

N6: 5'-AAAAAGAATTCATTAAAGAGGAGAAATTAAATGTGcGGtAAACAGACCCTGGAACG-3'

MetCysGlyLysGlnThrLeuGlu

und dem Plasmid pFX-EGF2-AP-CD (Beispiel 3) als Template DNA amplifiziert. Bei der PCR wurde mittels des N6 Primers der 5'-Bereich des Strukturgens (Aminosäureposition 2 und 3) an die in E. coli bevorzugt benutzten Kodons angepaßt ("ATG-Umgebung mit optimierter Codonusage", gekennzeichnet durch Kleinschreibung der Basen im N6 Primer), ohne die Proteinsequenz zu verändern.

Das ca. 960 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und HindIII verdaut und das ca. 950 Bp lange EcoRI/HindIII-FX Fragment nach Reinigung durch Agarosegelelektrophorese in das ca. 2,53 kbp lange EcoRI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment (Beispiel 1) ligiert. Das gewünschte Plasmid pFX-ΔEGF2-AP-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR amplifizierte FX DNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

**Beispiel 5****Konstruktion des FX Proteasegens mit Aktivierungspeptid und katalytischer Domäne (Plasmid: pFX-AP-CD)**

Die FX cDNA von Bp-Position 496-1362, kodierend für das Aktivierungspeptid und die katalytische Proteasedomäne von Aminosäureposition 166-454 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend Fig. 3) wurde mittels PCR unter Verwendung der PCR Primer N7 (SEQ ID NO: 7) und N2 (SEQ ID NO: 2)

NcoI

N7: 5'-AAAAAACCATGGTtGCTCAGGCTACCAGCAGCAGC-3'  
MetValAlaGlnAlaThrSerSerSer

und dem Plasmid pFX-EGF2-AP-CD (Beispiel 3) als Template DNA amplifiziert. Bei der PCR wurde mittels des N7 Primers der 5'-Bereich des Strukturgens (Aminosäureposition 2, 3 und 5) an die in E. coli bevorzugt benutzten Kodons angepaßt ("ATG-Umgebung mit optimierter Codonusage", gekennzeichnet durch Kleinschreibung der Basen im N7 Primer), ohne die Proteinsequenz zu verändern.

Das ca. 890 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und HindIII verdaut und das ca. 880 Bp lange NcoI/HindIII-FX Fragment nach Reinigung durch Agarosegelelektrophorese in das ca. 2,55 kBp lange NcoI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment (Beispiel 1) ligiert. Das gewünschte Plasmid pFX-AP-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR amplifizierte FX DNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

**Beispiel 6****Klonierung der katalytischen Domäne des FIX Proteasegens (Plasmid: pFIX-CD)**

Die FIX cDNA von Bp-Position 690-1403, kodierend für die FIX Proteasedomäne von Aminosäureposition 181-415 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend der Publikation von McGraw, R.A. et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 2847-2851; Fig. 4) wurde unter Verwendung der PCR Primer N8 (SEQ ID NO: 8) und N9 (SEQ ID NO: 9)

NcoI

N8: 5'-AAAAAACCATGGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACC-3'  
MetValValGlyGlyGluAspAlaLys

- 14 -

HindIII

N9: 5'-AAAAAAGCTTCATTAAGTCAGCTTTGTTTTTCCTTAATC-3'

und einer kommerziell erhältlichen humanen Leber cDNA Genbank (Vektor: Lambda ZAP® II) der Firma Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.) als Template DNA amplifiziert. Mittels der PCR Primer wurde am 5'-Ende der kodierenden Region eine singuläre NcoI Schnittstelle und ein ATG-Startkodon und am 3'-Ende der kodierenden Region eine singuläre HindIII Schnittstelle eingeführt.

Das ca. 730 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und HindIII verdaut und das ca. 720 Bp lange NcoI/HindIII-FIX Fragment nach Reinigung durch Agarosegelelektrophorese in das ca. 2,55 kBp lange NcoI/HindIII-pSAM-CORE Vektorfragment ligiert (Beispiel 1). Das gewünschte Plasmid pFIX-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR isolierte FIX cDNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

#### Beispiel 7

**Konstruktion des FIX Proteasegens mit EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid und katalytischer Domäne (Plasmid: pFIX-EGF2-AP-CD)**

Die FIX cDNA von Bp-Position 402-986, kodierend für die EGF2-Domäne, das Aktivierungspeptid und den N-terminalen Bereich der FIXa Proteasedomäne von Aminosäureposition 85-278 (cDNA Sequenz- und Aminosäuresequenz-Numerierung entsprechend Fig. 4) wurde unter Verwendung der PCR Primer N10 (SEQ ID NO: 10) und N11 (SEQ ID NO: 11)

NcoI

N10: 5'-AAAAACCATGGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCA-3'

MetAspValThrCysAsnIleLysAsnGly

N11: 5'-GGGTTCGTCCAGTCCAGAAGGGC-3'

und einer kommerziell erhältlichen humanen Leber cDNA Genbank (Vektor: Lambda ZAP® II) der Firma Stratagene (La Jolla, CA, U.S.A.) als Template DNA amplifiziert. Mittels des PCR Primers N10 wurde am 5'-Ende der kodierenden Region ein ATG-Startkodon und eine singuläre NcoI Schnittstelle eingeführt.



Das ca. 590 Bp lange PCR Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen NcoI und BsmI verdaut und das ca. 360 Bp lange NcoI/BsmI-FIX-EGF2-AP Fragment nach Reinigung durch Agarosegelelektrophorese in das ca. 3,2 kbp lange NcoI/BsmI-pFIX-CD Vektorfragment (Beispiel 6) ligiert. Das gewünschte Plasmid pFIX-EGF2-AP-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR isolierte FIX cDNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

### Beispiel 8

### **Konstruktion eines chimären Proteasegens aus FIX und FX (Plasmid: pFIX/X-EGF2-AP-CD)**

Das chimäre FIX/FX Proteasegen wurde aus dem N-terminalen Teil der FX EGF2-Domäne (Bp-Position: 322-462; Aminosäureposition: 108-154, Fig. 3), dem C-terminalen Teil der FIX EGF2, dem FIX Aktivierungspeptid und der FIX N-terminalen Halbseite (Bp-Position: 397-867; Aminosäureposition: 133-289, Fig. 4) und der FX C-terminalen Halbseite (Bp-Position: 964-1362; Aminosäureposition: 322-454; Fig. 3) zusammengesetzt.

Dazu wurde in einer ersten PCR Reaktion die DNA kodierend für den C-terminalen Teil der FIX EGF2, das FIX Aktivierungspeptid und die FIX N-terminale Halbseite von Bp-Position: 397-867 (Aminosäureposition: 133-289; Fig. 4) unter Verwendung der PCR Primer N12 (SEQ ID NO: 12) und N13 (SEQ ID NO: 13)

StuI  
N12: 5'-AAAAAAGGCCTGCATTCCACAGGGCCCTACCCCTGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAAAC-3'  
GlyArgValSerValSerGln--  
|133 FIX-EGF2 ->

N13: 5'-AAAAAatCCgGAAGGCAAATAGGTGTAACGTAGCTGTTTAGC-3'

und des Plasmids pFIX-EGF2-AP-CD (Beispiel 7) als Template DNA amplifiziert. Mittels der 5'-überhängenden Nukleotidsequenz des PCR Primers N12 wurde die FX-EGF2- mit der FIX-EGF2 DNA Sequenz verbunden. Sie besteht aus der FX DNA Sequenz von Bp-Position 430-462 (Fig. 3) mit einer singulären StuI Schnittstelle am 5'-Ende. Mit der 5'-überhängenden Nukleotidsequenz des N13 Primers wurde die FIX- mit der FX DNA verbunden. Sie besteht aus der FX DNA Sequenz von Bp-Position: 964-970 (Fig. 3). Durch 2 Bp-Substitutionen (durch Kleinschreibung der Basen im N13 Primer gekennzeichnet) wurde in dieser Sequenz eine singuläre MroI Schnittstelle erzeugt, ohne die Proteinsequenz zu verändern. In einer

zweiten PCR Reaktion wurde die FX C-terminale Halbseite von Bp-Position: 964-1362 (Aminosäureposition: 322-454; Fig. 3) unter Verwendung der PCR Primer N14 (SEQ ID NO: 14) und N2 (SEQ ID NO: 2)

MroI

N14: 5'-AAAAAATCCGAGCGTGACTGGGCCGAGTCC-3'

und des Plasmids pFX-EGF2-AP-CD (Beispiel 3) als Template DNA amplifiziert. Mittels des N14 Primers wurde am 5'-Ende innerhalb der kodierenden FX-CD Region durch 2 Bp-Substitutionen (durch Kleinschreibung der Basen im N14 Primer gekennzeichnet) eine singuläre MroI Schnittstelle eingeführt, ohne die Aminosäuresequenz zu verändern.

Das erste PCR Produkt wurde mit StuI und MroI und das zweite PCR Produkt mit MroI und HindIII verdaut. Danach wurde in einer Dreifragmentligation das ca. 510 Bp lange StuI/MroI-Fragment mit dem ca. 400 Bp langen MroI/HindIII-Fragment und dem ca. 2640 Bp langen StuI/HindIII-pFX-EGF2-AP-CD Vektorfragment (Beispiel 3) ligiert. Das gewünschte Plasmid pFIX/X-EGF2-AP-CD wurde durch Restriktionskartierung identifiziert und die durch PCR amplifizierte FIX/X DNA Sequenz durch DNA Sequenzierung überprüft.

## Beispiel 9

### a) Expression der Proteasegene in *E. coli*

Zur Expression der Proteasegene wurde der *E. coli* K12 Stamm UT5600 (Grodberg, J. und Dunn, J.J., J. Bacteriol. 170 (1988) 1245-1253) jeweils mit einem der in den Beispielen 1-8 beschriebenen Expressionsplasmiden pFX-CD, pFX-EK-CD, pFX-EGF2-AP-CD, pFX-ΔEGF2-AP-CD, pFX-AP-CD, pFIX-CD, pFIX-EGF2-AP-CD und pFIX/X-EGF2-AP-CD (Ampicillin-Resistenz) und dem lacI<sup>q</sup>-Repressorplasmid pUBS520 (Kanamycin-Resistenz, Herstellung und Beschreibung siehe: Brinkmann, U. et al., Gene 85 (1989) 109-114) transformiert.

Die mit den Expressionsplasmiden pFX-CD, pFX-EK-CD, pFX-EGF2-AP-CD, pFX-ΔEGF2-AP-CD, pFX-AP-CD, pFIX-CD, pFIX-EGF2-AP-CD und pFIX/X-EGF2-AP-CD transformierten UT5600/pUBS520/Zellen wurden in Schüttelkultur in DYT-Medium (1% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Bacto Tryptone, Difco, und 0,5% NaCl) mit 50-100 mg/l Ampicillin und 50 mg/l Kanamycin bei 37°C bis zu einer optischen Dichte bei 550 nm (OD<sub>550</sub>) von 0,6-0,9 angezogen und anschließend mit IPTG (1-5 mmol/l Endkonzentration) induziert. Nach einer

Induktionsphase von 4 - 8 Stunden (Std.) bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GS3 Rotor, 6000 UPM, 15 min) geerntet, mit 50 mmol/l Tris-HCl Puffer, pH 7,2 gewaschen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Die Zellausbeute aus einer 1 l Schüttelkultur betrug 4-5 g (Naßgewicht).

#### **b) Expressionsanalyse**

Die Expression der mit den Plasmiden pFX-CD, pFX-EK-CD, pFX-EGF2-AP-CD, pFX-ΔEGF2-AP-CD, pFX-AP-CD, pFIX-CD, pFIX-EGF2-AP-CD und pFIX/X-EGF2-AP-CD transformierten UT5600/pUBS520/Zellen wurde analysiert. Dazu wurden Zellpellets aus jeweils 1 ml abzentrifugiertem Anzuchtmedium in 0,25 ml 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2 resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (2 Pulse à 30 s mit 50% Intensität) mit einem Sonifier® Cell Disruptor B15 der Firma Branson (Heusenstamm, BRD) aufgeschlossen. Die unlöslichen Zellbestandteile wurden sedimentiert (Eppendorf 5415 Zentrifuge, 14000 UPM, 5 min) und der Überstand mit 1/5 Volumen (Vol) 5xSDS-Probenpuffer (1xSDS-Probenpuffer: 50 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8, 1% SDS, 1% Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0.001% Bromphenolblau) versetzt. Die unlösliche Zelltrümmerfraktion (Pellet) wurde in 0,3 ml 1xSDS-Probenpuffer mit 6 - 8 M Harnstoff resuspendiert, die Proben 5 min bei 95°C inkubiert und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Proteine durch SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) und mit Coomassie Brilliant Blue R Farbstoff angefärbt.

Die in *E. coli* synthetisierten Proteasevarianten waren homogen und wurden ausschließlich in der unlöslichen Zelltrümmerfraktion gefunden ("inclusion bodies", IBs). Die Expressionshöhe betrug 10-50% bezogen auf das *E. coli* Gesamtprotein.

#### **Beispiel 10**

##### **Zellyse, Solubilisierung und Naturierung der Proteasevarianten**

#### **a) Zellyse und Präparation der "inclusion bodies" (IBs)**

Das Zellpellet aus 3 l Schüttelkultur (ca. 15 g Naßgewicht) wurde in 75 ml 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, resuspendiert. Die Suspension wurde mit 0,25 mg/ml Lysozym versetzt und 30 min bei 0°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 mmol/l MgCl<sub>2</sub> und 10 µg/ml DNase I (Boehringer Mannheim GmbH, Kat.-Nr. 104159) wurden die Zellen mechanisch mittels Hochdruckdispersion in einer French® Press der Firma SLM Amico (Urbana, IL, U.S.A.) aufgeschlossen.

Anschließend wurde die DNA 30 min bei Raumtemperatur (RT) verdaut. Der Ansatz wurde mit 37,5 ml 50 mmol/l Tris-HCl pH 7,2, 60 mmol/l EDTA, 1,5 mol/l NaCl, 6% Triton X-100 versetzt, weitere 30 min bei RT inkubiert und in einer Sorvall RC-5B Zentrifuge (GSA Rotor, 12000 UPM, 15 min) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 100 ml 50 mmol/l Tris-HCl, pH 7,2, 20 mmol/l EDTA versetzt, 30 min unter Rühren bei 4°C inkubiert und erneut sedimentiert. Der letzte Waschschrift wurde wiederholt. Die gereinigten IBs (1,5-2,0 g Naßgewicht, 25-30% Trockenmasse, 100-150 mg Protease) wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

**b) Solubilisierung und Derivatisierung der IBs**

Die gereinigten IBs wurden in einer Konzentration von 100 mg IB-Pellet (Naßgewicht)/ml entsprechend 5-10 mg/ml Protein in 6 mol/l Guanidinium-HCl, 100 mmol/l Tris-HCl, 20 mmol/l EDTA, 150 mmol/l GSSG und 15 mmol/l GSH, pH 8,0 unter Rühren bei RT in 1-3 Std. gelöst. Anschließend wurde der pH auf pH 5,0 eingestellt und die unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor, 16000 UPM, 10 min) abgetrennt. Der Überstand wurde gegen 100 Vol 4-6 mol/l Guanidinium-HCl pH 5,0 für 24 Std. bei 4°C dialysiert.

**c) Naturierung**

Die Naturierung der in 6 mol/l Guanidinium-HCl solubilisierten und mit GSSG/GSH derivatisierten Proteasevarianten wurde bei 4°C durch wiederholte (z.B. 3-fache) Zugabe von jeweils 0,5 ml IB-Solubilisat/Derivat zu 50 ml 50 mmol/l Tris-HCl, 0,5 mol/l Arginin, 20 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 1 mmol/l EDTA und 0,5 mmol/l Cystein, pH 8,5 im Zeitabstand von 24 Std. und anschließende Inkubation für 48 Std. bei 4°C bewirkt. Nach Abschluß der Naturierungsreaktion wurden unlösliche Bestandteile durch Filtration mit einem Filtrationsgerät der Firma Satorius (Göttingen, BRD) bestückt mit Tiefenfilter K 250 der Firma Seitz (Bad Kreuznach, BRD) abgetrennt.

**d) Konzentrierung und Dialyse der Naturierungsansätze**

Der klare proteasehaltige Überstand wurde durch Cross-Flow-Filtration in einer Minisetze (Membran Typ: Omega 10K) der Firma Filtron (Karlstein, BRD) 10-15-fach konzentriert und zur Entfernung von Guanidinium-HCl und Arginin gegen 100 Vol 20 mmol/l Tris-HCl und 50 mmol/l NaCl, pH 7,2 für 24 Std. bei 4°C dialysiert. Präzipitiertes Protein wurde durch Zentri-

fugation abgetrennt (Sorvall RC-5B Zentrifuge, SS34 Rotor, 16000 UPM, 20 min) und der klare Überstand mit einer Nalgene® Einmalfiltrationseinheit (Porendurchmesser: 0,2 µm) der Firma Nalge (Rochester, NY, U.S.A.) filtriert.

**e) Bestimmung der Naturierungseffizienz**

Die Proteinkonzentration der naturierten konzentrierten und filtrierten Naturierungsansätze wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 280 nm unter Verwendung der anhand der Aminosäuresequenzen errechneten molaren Extinktionskoeffizienten für rFX-CD, rFX-EK-CD, rFX-EGF2-AP-CD, rFX-ΔEGF2-AP-CD, rFX-AP-CD, rFIX-CD, rFIX-EGF2-AP-CD und rFIX/X-EGF2-AP-CD ermittelt.

Eine Probe der Naturierungsansätze, bestehend aus nativ gefalteter Protease und falsch disulfidverbrückten Proteaseoligomeren, wurde durch nicht-reduzierende SDS PAGE aufgetrennt (Beispiel 13 b). Die gewünschten löslichen monomeren Proteasezymogene wurden anhand des apparenten Molekulargewichts und der Bandenschärfe identifiziert. Aus dem Vergleich (Verhältnis) der Bandenintensitäten von monomerem Proteasezymogen zu den restlichen Banden ("Proteinschmier") wurde die "Naturierungseffizienz" abgeschätzt.

Proteasevariante	molarer Extinktionskoeffizient [ cm <sup>2</sup> mol <sup>-1</sup> ]	Molekulargewicht [ kDa ]	Naturierungseffizienz [ % ]
rFX-CD	33540	27.3	< 0.1
rFX-EK-CD	33540	28.4	< 0.1
rFX-EGF2-AP-CD	43490	39.3	5-10
rFX-ΔEGF2-AP-CD	40570	34.3	< 0.1
rFX-AP-CD	40510	32.9	< 0.1
rFIX-CD	41670	26.3	< 0.1
rFIX-EGF2-AP-CD	44650	36.9	15-20
rFIX/X-EGF2-AP-CD	43370	37.5	10-15

**Ergebnis:**

Nur die Proteasevarianten mit EGF2-Domäne, Aktivierungspeptid (AP) und katalytischer Domäne (CD) ließen sich naturieren.

**Beispiel 11****Reinigung der naturierten inaktiven Proteasevarianten**

Die inaktiven Proteasevarianten aus den Naturierungsansätzen können bei Bedarf mit chromatographischen Methoden, die dem Fachmann bekannt sind, weiter gereinigt werden.

**a) Reinigung der Proteasevarianten durch Ionenaustauschchromatographie an Q-Sepharose-ff**

Der konzentrierte und gegen 20 mmol/l Tris-HCl und 50 mmol/l NaCl, pH 8,0 dialysierte Naturierungsansatz wurde auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte Q-Sepharose-ff Säule (1,5 x 11 cm, V = 20 ml; Beladungskapazität: 10 mg Protein / ml Gel) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD) aufgetragen (2 Säulenvolumen/Stunde, 2 SV/Std.) und so lange mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm den Leerwert des Puffers erreichte. Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch einen Gradienten von 50-500 mmol/l NaCl in 20 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 (2 SV/Std.). Die Proteasen wurden bei einer NaCl Konzentration von 100-150 mmol/l eluiert. Die proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE identifiziert und der Elutionspeak vereinigt.

**b) Endreinigung der inaktiven Proteasevarianten durch Ionenaustauschchromatographie an Heparinsepharose CL-6B**

Die vereinigten proteasehaltigen Fraktionen nach Chromatographie an Q-Sepharose-ff wurden direkt auf eine mit 20 mmol/l Tris-HCl und 200 mmol/l NaCl, pH 8,0 äquilibrierte Heparinsepharose CL-6B Säule (1,5 x 11 cm; V = 20 ml, Beladungskapazität: 1 mg Protein / ml Gel) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD) aufgetragen (2 SV/Std.). Danach wurde so lange mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm den Leerwert des Puffers erreichte. Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch einen Gradienten von 0,2-1,0 mol/l NaCl in 20 mmol/l Tris-HCl, pH 8,0 (2 SV/Std.). Die Proteasen wurden bei einer NaCl Konzentration von 500-600 mmol/l eluiert. Die proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE identifiziert, der Elutionspeak vereinigt und gegen 20 mmol/l Tris-HCl, 50-200 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8 dialysiert.

**Beispiel 12****Aktivierung und Reinigung der aktivierten Proteasevarianten**

Die naturierten gereinigten inaktiven rFIX- und rFX Proteasevarianten wurden mit gereinigter "Russels viper venom" (RVV-X) Protease aktiviert. Die RVV-X Protease wurde, wie in der Publikation von Esmon, C.T. (Prothrombin activation, doctoral dissertation, Washington University, St. Louis, MO (1973)) beschrieben, aus dem kommerziell erhältlichen Schlagengift Lyophilisat der Firma Sigma Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, BRD) durch Gelfiltration gefolgt von Ionenaustausch-Chromatographie an Q-Sepharose-ff gereinigt.

**a) Aktivierung und Reinigung der rFIX-EGF2-AP-CD Proteasevariante mit RVV-X**

Die Proteasevariante rFIX-EGF2-AP-CD wurde in einer Konzentration von 0,5 bis 2,0 mg/ml und einem Protease/Substrat-Verhältnis von 1:10 bis 1:20 in 20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8 bei 25°C verdaut. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen FIX Aktivierung wurde durch Aktivitätsbestimmung mit einem chromogenen Substrat (siehe Beispiel 13 a) bis zur Vollständigkeit des Verdaus (Plateau, maximale Aktivierung) verfolgt. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von bis zu 24 Std. Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 3-4 Std. entnommen und die generierte rFIXa Aktivität bestimmt. Nach Erreichen des Aktivierungsplateaus wurde der RVV-X Verdau durch Negativ-Chromatographie an Q-Sepharose-ff gereinigt.

RVV-X und nicht aktivierte rFIX-EGF2-AP-CD Protease binden unter den vorgegebenen Bedingungen an Q-Sepharose-ff, die aktivierte rFIXa-EGF2-AP-CD Protease jedoch nicht.

Der Verdauansatz wurde auf eine mit 20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l NaCl, pH 7,8 äquilibrierte Q-Sepharose-ff-Säule (1,0 x 10 cm, V = 8 ml) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD) aufgetragen (2 SV/Std.) und die Säule mit Äquilibrierungspuffer unter Fraktionierung entwickelt. Die rFIXa-EGF2-AP-CD proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE und Aktivitätsbestimmung identifiziert.

**b) Aktivierung und Reinigung der rFX-EGF2-AP-CD Proteasevariante mit RVV-X**

Die Proteasevariante rFX-EGF2-AP-CD wurde in einer Konzentration von 0,5 bis 2,0 mg/ml und einem Protease/Substrat-Verhältnis von 1:100 bis 1:200 in 20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8 bei 25°C verdaut. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen

rFX-EGF2-AP-CD Aktivierung wurde durch Aktivitätsbestimmung mit einem chromogenen Substrat (siehe Beispiel 13 a) bis zur Vollständigkeit des Verdaus (Plateau, maximale Aktivierung) verfolgt. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von bis zu 4 Std. Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 15-30 min entnommen und die generierte FXa Aktivität bestimmt. Nach Erreichen des Aktivierungsplateaus wurde die aktive rFXa-EGF2-AP-CD Protease durch Chromatographie an Benzamidin-Sepharose-CL-6B gereinigt.

Nur die aktivierte rFXa-EGF2-AP-CD Proteasevariante bindet unter den vorgegebenen Bedingungen an Benzamidin-Sepharose-CL-6B.

Der Verdauansatz wurde auf eine mit 20 mmol/l Tris-HCl, 200 mmol/l NaCl, pH 8,0 äquilibrierte Benzamidin-Sepharose-CL-6B Säule (1,0 x 10 cm, V = 8 ml; Beladungskapazität: 2-3 mg Protein / ml Gel) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD) aufgetragen (2 SV/Std.) und so lange mit dem Äquilibrierungspuffer gewaschen, bis die Absorption des Eluats bei 280 nm den Leerwert des Puffers erreichte. Die Elution des gebundenen Materials erfolgte durch 10 mmol/l Benzamidin in 20 mmol/l Tris-HCl, 200 mmol/l NaCl, pH 8,0 (2 SV/Std.). Die rFXa-EGF2-AP-CD proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE und Aktivitätsbestimmung identifiziert.

**c) Aktivierung mit RVV-X und Reinigung der chimären rFIX/X-EGF2-AP-CD Proteasevariante**

Die Proteasevariante rFIX/X-EGF2-AP-CD wurde in einer Konzentration von 0,5 bis 2,0 mg/ml und einem Protease/Substrat-Verhältnis von 1:10 bis 1:20 in 20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, pH 7,8 bei 25°C verdaut. Der zeitliche Verlauf der enzymatischen rFIX/X-EGF2-AP-CD Aktivierung wurde durch Aktivitätsbestimmung mit einem chromogenen Substrat (siehe Beispiel 13 a) bis zur Vollständigkeit des Verdaus (Plateau, maximale Aktivierung) verfolgt. Dazu wurden aus dem Reaktionsansatz über einen Zeitraum von bis zu 24 Std. Proben (10 bis 100 µl) im Abstand von 3-4 Std. entnommen und die generierte rFIX/Xa-EGF2-AP-CD Aktivität bestimmt. Nach Erreichen des Aktivierungsplateaus wurde der RVV-X Verdau durch Negativ-Chromatographie an Q-Sepharose-ff gereinigt.

RVV-X und nicht aktivierte rFIX/X-EGF2-AP-CD Protease binden unter den vorgegebenen Bedingungen an Q-Sepharose-ff, die aktivierte rFIX/Xa-EGF2-AP-CD Proteasevariante jedoch nicht.



Der Verdauansatz wurde auf eine mit 20 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l NaCl, pH 7,8 äquilibrierte Q-Sepharose-ff Säule (1,0 x 10 cm, V = 8 ml) der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD) aufgetragen (3 SV/Std.) und die Säule mit Äquilibrierungspuffer unter Fraktionierung entwickelt. Die rFIX/Xa-EGF2-AP-CD proteasehaltigen Fraktionen wurden durch nicht-reduzierende und reduzierende SDS PAGE und Aktivitätsbestimmung identifiziert.

### Beispiel 13

#### Charakterisierung der gereinigten Proteasevarianten

##### a) Aktivitätstest

Die Aktivität der naturierten aktivierten rFIXa-EGF2-AP-CD, rFXa-EGF2-AP-CD und rFIXa/Xa-EGF2-AP-CD Proteasevarianten wurde mit dem chromogenen Substrat Chromozym X (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, BRD, Kat.-Nr. 789763) bestimmt. 10-100 µl Probe wurden mit 190-100 µl 50 mmol/l Tris-HCl, 150 mmol/l NaCl, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 0,1% Polyethylenglycol 8K (PEG 8000), pH 8,0, auf 200 µl aufgefüllt, mit 20 µl Chromozym X (0,5-40 mmol/l) versetzt und in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 405 nm und RT gegen einen Reagenzienleerwert vermessen. Die Aktivität und die kinetischen Konstanten wurden aus der linearen Anfangssteigung gemäß der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt.

##### b) SDS-PAGE

Sowohl die Oligomeren- und Aggregatbildung durch intermolekulare Disulfidbrückenbildung als auch die Homogenität und Reinheit der naturierten aktivierten und gereinigten Proteasevarianten wurde durch nicht-reduzierende (minus Mercaptoethanol) und reduzierende (plus Mercaptoethanol) SDS PAGE (Laemmli, U.K., Nature 227 (1970) 680-685) untersucht.

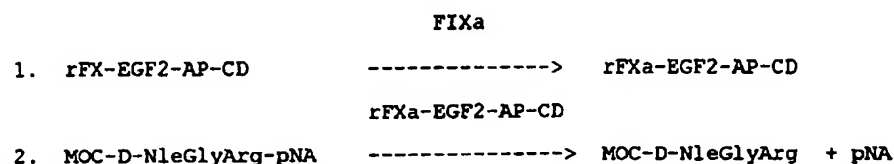
### Beispiel 14

#### FX Aktivatorrest

Das rekombinant hergestellte hochreine inaktive rFX-EGF2-AP-CD Zymogen (frei von jeglicher störender Nebenaktivität) eignet sich hervorragend z.B. zur Bestimmung geringer FIXa Konzentrationen in wäßrigen Lösungen, vorzugsweise in Körperflüssigkeiten wie Blut oder Plasma. FIXa aktiviert durch Spaltung das inaktive rFX-EGF2-AP-CD Zymogen. Die Zymogenaktivierung wird durch eine gekoppelte Indikatorreaktion mit einem chromogenen FXa

Peptidsubstrat wie z.B. Chromozym X gemessen. Die zu bestimmende FIXa Aktivität wird durch das Verstärkersystem der Zymogenaktivierung amplifiziert. Solch eine FIXa Test ist z.B. bei Van Dam-Mieras, M.C.E. et al., In: Bergmeyer, H.U. (ed.), Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V, page 365-394, 3rd ed., Academic Press, New York (1983) beschrieben.

#### Testprinzip:



Meßsignal: pNA (p-Nitroanilin)  
 FXa Substrat: MOC-D-NleGlyArg-pNA (Chromozym X)

Testansatz: 200 µl Puffer  
 + 20 µl rFX-EGF2-AP-CD (0,13 mg/ml; 4 µmol/l)  
 + 25 µl Substrat (Chromozym X, 8 mmol/l)  
 + 20 µl FIXa Probe

Puffer: 50 mmol/l Tris HCl, pH 8,0; 150 mmol/l NaCl; 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>;  
 0,1 % PEG 8000

Der Testansatz wurde in einer Mikrotiterplatte bei RT inkubiert und die Extinktion bei 405 nm gegen einen Reagenzienleerwert in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. Die direkte Umsetzung von Chromozym X durch FIXa ist unter den vorgegebenen Testbedingungen vernachlässigbar.

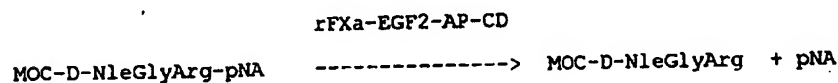
Die Faktor IXa katalysierte Aktivierung des Zymogens rFX-EGF2-AP-CD wird mit dem chromogenen Peptidsubstrat Chromozym X gemessen. Die Entstehung von p-Nitroanilin (Meßsignal) ist ein Maß (proportional) für die vorhandene (zu bestimmende) Faktor IX Aktivität.

**Beispiel 15****Kristallisation von rFXa-EGF2-AP-CD**

Die aktivierte gereinigte rekombinant hergestellte rFXa-EGF2-AP-CD Protease wurde gegen 2 x 100 Vol 5 mmol/l HEPES Puffer, pH 6,5 bei 4°C für 6 Std. dialysiert und anschließend in einem Centrikon® 10 Mikrokonzentrator der Firma Amicon (Witten, BRD) auf eine Konzentration von 10 mg/ml eingengt. Die Kristallisation erfolgte durch Dampfdiffusion in einem sitzenden Tropfen. 4 µl konzentrierte rFXa-EGF2-AP-CD Protease (in äquimolarer Konzentration mit dem Inhibitor H-Glu-Gly-Arg-Chlormethylketon (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, BRD) wurden mit 4 µl 100 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 22% Polyethylenglycol 6K (PEG 6K), pH 8,2 bei 4°C versetzt und gegen ein Reservoir von 500 µl 100 mmol/l Tris-HCl, 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>, 22% PEG 6K, pH 8,2 bei 4°C über Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen äquilibriert. Kristalle wuchsen nach 3-7 Tagen.

**Beispiel 16****Test zur Auffindung von FXa Inhibitoren**

FXa Proteaseinhibitoren wurden durch Inhibition der FXa Aktivität identifiziert. Dazu wurde die FXa Aktivität der rekombinant hergestellten rFXa-EGF2-AP-CD Proteasevariante in Ab- und Anwesenheit der zu testenden Substanz oder eines Substanzgemisches bestimmt und durch Quotientenbildung die prozentuale Hemmung errechnet. Die Hemmkonstante K<sub>i</sub> wurde aus einer Hemmkinetik ermittelt.

**Testprinzip:**

Meßsignal: pNA (p-Nitroanilin)  
FX Substrat: MOC-D-NleGlyArg-pNA (Chromozym X)

**Testansatz:** 200 µl Puffer  
+ 20 µl rFXa-EGF2-AP-CD (0,13 mg/ml; 4 µmol/l)  
+ 25 µl Substrat (Chromozym X, 8 mmol/l)  
+ 20 µl Inhibitor

**Puffer:** 50 mmol/l Tris HCl, pH 7,4; 150 mmol/l NaCl; 5 mmol/l CaCl<sub>2</sub>; 0,1% PEP

Der Testansatz wurde in einer Mikrotiterplatte bei RT inkubiert und lineare Anfangssteigerung ( $\Delta E/\text{min}$ ) durch Extinktionsmessungen bei 405 nm bestimmt.

### **Referenzliste**

**Bang, N.U.; Beckmann, R.J.; Jaskunas, S.R.; Lai, M.-H.T.; Little, S.P.; Long, G.L.; Santerre, R.F.:** Vectors and methods for expression of human protein C activity. EP 0 191 606.

**Bergmeyer, H.U. (ed.):** Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V, chapter 3, 3rd ed., Academic Press, New York (1983).

**Bharadwaj, D.; Harris, R.J.; Kisiel, W.; Smith, K.J.:** Enzymatic removal of sialic acid from human factor IX and factor X has no effect on their coagulant activity. J. Biol. Chem. 270, 6537-6542 (1995).

**Blow, D.M.:** Structure and mechanism of chymotrypsin. Acc. Chem. Res. 9, 145-152 (1976).

**Brinkmann, U.; Mattes, R.E.; Buckel, P.:** High-level of recombinant genes in Escherichia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. Gene 85, 109114 (1989).

**Van Dam-Mieras, M.C.E.; Muller, A.D.; van Dieijen, G.; Hemker, H.C.:** Blood coagulation factors II, V, VII, VIII, IX, X and XI: Determination with synthetic substrates. In: Bergmeyer, H.U. (ed.): Methods of Enzymatic Analysis, Vol. V, Enzymes 3: Peptidases, Proteinases and Their Inhibitors, page 365-394, 3rd ed., Academic Press, New York (1983).

**Davie, E.W.; Fujikawa, K.; Kisiel, W.:** The coagulation cascade: Initiation, maintenance, and regulation. Biochem. 30, 10363-10379 (1991).

**DiBella, E.E.; Maurer, M.C.; Scheraga, H.A.:** Expression and folding of recombinant bovine prothrombin-2 and its activation to thrombin. J. Biol. Chem. 270, 163-169 (1995).

**Esmon, C.T.:** Prothrombin activation, doctoral dissertation, Washington University, St. Louis, MO (1973).

- 27 -

- Fujikawa, K.; Legaz, M.E.; Davie, E.W.: Bovine factor XI (Stuart factor). Mechanism of activation by a protein from Russell's viper venom. *Biochem.* 11, 4892-4898 (1972).
- Furie, B.; Furie, B.C.: The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53, 505-518 (1988).
- Grodberg, J.; Dunn, J.J.: OmpT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* 170, 1245-1253 (1988).
- Hagen, F.S.; Murray, M.J.; Busby, S.J.; Berkner, K.L.; Insley, M.Y.; Woodbury, R.G.; Gray, C.L.: Expression of factor VII activity in mammalian cells. EP 0 200 421.
- Hertzberg, M.S.; Ben-Tal, O.; Furie, B.; Furie, B.C.: Construction, expression, and characterization of a chimera of factor IX and factor X. *J. Biol. Chem.* 267, 14759-14766 (1992).
- Holly, R.D.; Foster, D.C.: Methods for producing thrombin. WO 93/13208.
- Kaul, R.K.; Hildebrand, B.; Roberts, S.; Jagadeeswaran, P.: Isolation and characterization of human blood-coagulation factor X cDNA. *Gene* 41, 311-314 (1986).
- Kopetzki, E.; Rudolph, R.; Grossmann, A.: Recombinant core-streptavidin. WO 93/09144.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
- Lin, S.-W.; Smith, K.J.; Welsch, D.; Stafford, D.W.: Expression and characterization of human factor IX and factor IX-factor X chimeras in mouse C127 cells. *J. Biol. Chem.* 265, 144-150 (1990).
- McGraw, R.A.; Davis, L.M.; Noyes, C.M.; Lundblad, R.L.; Roberts, H.R.; Graham, J.B.; Stafford, D.W.: Evidence for a prevalent dimorphism in the activation peptide of human coagulation factor IX. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 2847-2851 (1985).
- Medved, L.V.; Orthner, C.L.; Lubon, H.; Lee, T.K.; Drohan, W.N.; Ingham, K.C.: Thermal stability and domain-domain interactions in natural and recombinant protein C. *J. Biol. Chem.* 270, 13652-13659 (1995).

Mullis, K.B.; Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, 355-350 (1987).

Nicolaisen, E.M.; Bjorn, S.E.; Wiberg, F.C.; Woodbury, R.: Modified factor VII/VIIa. WO 88/10295

Pedersen, A.H.; Lund-Hansen, T.; Bisgaard-Frantzen, H.; Olsen, F.; Petersen, L.C.: Autoactivation of human recombinant coagulation factor VII. *Biochem.* 28, 9391-9336 (1989).

Polgar, L.: Structure and function of serine proteases. In: *Mechanisms of protein action*. Boca Raton, Florida, CRC Press, chapter 3 (1989).

Rezaie, A.R.; Neuenschwander, P.F.; Morrissey, J.H.; Esmon, C.T.: Analysis of the functions of the first epidermal growth factor-like domain of factor X. *J. Biol. Chem.* 268, 8176-8180 (1993).

Rezaie, A.R.; Esmon, C.T.: Asp-70-Lys mutant of factor X lacks high affinity  $\text{Ca}^{2+}$  binding site yet retains function. *J. Biol. Chem.* 269, 21495-21499 (1994).

Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1989).

Sheehan, J.P.; Wu, Q.; Tollefsen, D.M.; Sadler, J.E.: Mutagenesis of thrombin selectively modulates inhibition by serpins heparin cofactor II and antithrombin III. *J. Biol. Chem.* 268, 3639-3645 (1993).

Thogersen, H.C.; Holtet, T.L.; Etzerodt, M.: Improved method for the refolding of proteins. WO 94/18227.

Wolf, D.L.; Sinha, U.; Hancock, T.E.; Lin, P.-H.; Messier, T.L.; Esmon, C.T.; Church, W.R.: Design of constructs for the expression of biologically active recombinant human factor X and Xa. *J. Biol. Chem.* 266, 13726-13730 (1991).

**Yee, J.; Rezaie, A.R.; Esmon, C.T.:** Glycosaminoglycan contributions to both protein C activation and thrombin inhibition involve a common arginine-rich site in thrombin that includes residues arginine 93, 97, and 101. *J. Biol. Chem.* 269, 17965-17970 (1994).

**Zhong, D.G.; Smith, K.J.; Birktoft, J.J.; Bajaj, S.P.:** First epidermal growth factor-like domain of human blood coagulation factor IX is required for its activation by factor VIIa tissue factor but not by factor XIa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 3574-3578 (1994).

- 30 -

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-68305
- (G) TELEFON: 08856/60-3446
- (H) TELEFAX: 08856/60-3451

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Rekombinante Blutgerinnungs-  
proteasen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 17

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AAAAAAGAAT TCTCATGATC GTGGGAGGCC AGGAATGCAA G

41

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 41 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"



- 31 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

AAAAAAAGC TTCATTACTT GGCCTTGGGC AAGCCCCTGG T

41

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 77 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

AATTCATTAA AGAGGAGAAA TTAAATGCA TCACCACCAC GACGATGACG ACAAGATCGT

60

GGGAGGCCAG GAATGCA

77

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 71 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CATTCCTGGC CTCCCACGAT CTTGTCGTCA TCGTCGTGGT GGTGATGCAT TTTAATTCT

60

CCTCTTTAAT G

71

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 59 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid  
(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

- 32 -

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

AAAAAAGAAT TCATTAAAGA GGAGAAATTA AAATGCGGAA GCTCTGCAGC CTGGACAAC 59

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 58 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

AAAAAAGAAT TCATTAAAGA GGAGAAATTA AAATGTGCGG TAAACAGACC CTGGAACG 58

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

AAAAAACCAT GGTGCTCAG GCTACCAGCA GCAGC 35

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 37 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid

(A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

AAAAAACCAT GGTGTTGGT GGAGAAGATG CCAAACC 37

- 33 -

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

AAAAAAAAGC TTCATTAAGT GAGCTTTGTT TTTTCCTTAA TC

42

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 39 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAAAAACCAT GGATGTAACA TGTAACATTA AGAATGGCA

39

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

GGGTTCGTCC AGTTCAGAA GGGC

24

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- 34 -

- (A) LÄNGE: 61 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

AAAAAAAGGC CTGCATTCCC ACAGGGCCCT ACCCCTGTGG AAGAGTTTCT GTTTCACAAA 60

C 61

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

AAAAAATCCG GAAGGCAAAT AGGTGTAACG TAGCTGTTTA GC 42

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) TOPOLOGIE: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: other nucleic acid
  - (A) BESCHREIBUNG: /desc = "primer"

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

AAAAAATCCG GAGCGTGACT GGGCCGAGTC C 31

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
  - (A) LÄNGE: 1404 Basenpaare
  - (B) ART: Nucleotid

- 35 -

(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(xi). SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

CTGCTCGGGG AAAGTCTGTT CATCCGCAGG GAGCAGGCCA ACAACATCCT GGCGAGGGTC	60
ACGAGGGCCA ATTCTTTTCT TGAAGAGATG AAGAAAGGAC ACCTCGAAAG AGAGTGCATG	120
GAAGAGACCT GCTCATACGA AGAGGCCCGC GAGGTCTTTG AGGACAGCGA CAAGACGAAT	180
GAATTCTGGA ATAAATACAA AGATGGCGAC CAGTGTGAGA CCAGTCCTTG CCAGAACCAG	240
GGCAAATGTA AAGACGGCCT CGGGGAATAC ACCTGCACCT GTTTAGAAGG ATTCGAAGGC	300
AAAACTGTG AATTATTCAC ACGGAAGCTC TGCAGCCTGG ACAACGGGGA CTGTGACCAG	360
TTCTGCCACG AGGAACAGAA CTCTGTGGTG TGCTCCTGCG CCCGCGGGTA CACCCTGGCT	420
GACAACGGCA AGGCCTGCAT TCCCACAGGG CCCTACCCCT GTGGGAAACA GACCCTGGAA	480
CGCAGGAAGA GGTCACTGGC CCAGGCCACC AGCAGCAGCG GGGAGGCCCC TGACAGCATC	540
ACATGGAAGC CATATGATGC AGCCGACCTG GACCCACCG AGAACCCTT CGACCTGCTT	600
GACTTCAACC AGACGCAGCC TGAGAGGGGC GACAACAACC TCACCAGGAT CGTGGGAGGC	660
CAGGAATGCA AGGACGGGGA GTGTCCCTGG CAGGCCCTGC TCATCAATGA GGAAAACGAG	720
GGTTTCTGTG GTGGAACCAT TCTGAGCGAG TTCTACATCC TAACGGCAGC CCACTGTCTC	780
TACCAAGCCA AGAGATTCGA AGGGGACCGG AACACGGAGC AGGAGGAGGG CGGTGAGGCG	840
GTGCACGAGG TGGAGGTGGT CATCAAGCAC AACCGGTTCA CAAAGGAGAC CTATGACTTC	900
GACATCGCCG TGCTCCGGCT CAAGACCCCC ATCACCTTCC GCATGAACGT GGCGCCTGCC	960
TGCCTCCCCG AGCGTGA CTG GGGCAGTCC ACGCTGATGA CGCAGAAGAC GGGGATTGTG	1020
AGCGGCTTCG GGCGCACCCA CGAGAAGGGC CGGCAGTCCA CCAGGCTCAA GATGCTGGAG	1080
GTGCCCTACG TGGACCGCAA CAGCTGCAAG CTGTCCAGCA GCTTCATCAT CACCCAGAAC	1140
ATGTTCTGTG CCGGCTACGA CACCAAGCAG GAGGATGCCT GCCAGGGGGA CAGCGGGGGC	1200
CCGCACGTCA CCCGCTTCAA GGACACCTAC TTCGTGACAG GCATCGTCAG CTGGGGAGAG	1260
GGCTGTGCCC GTAAGGGGAA GTACGGGATC TACACCAAGG TCACCGCCTT CCTCAAGTGG	1320
ATCGACAGGT CCATGAAAC CAGGGGCTTG CCCAAGGCCA AGAGCCATGC CCCGGAGGTC	1380
ATAACGTCCT CTCCATTAAA GTGA	1404

- 36 -

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1389 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

ATGCAGCGCG TGAACATGAT CATGGCAGAA TCACCAGGCC TCATCACCAT CTGCCTTTTA	60
GGATATCTAC TCAGTGCTGA ATGTACAGTT TTTCTTGATC ATGAAAACGC CAACAAAATT	120
CTGAATCGGC CAAAGAGGTA TAATTCAGGT AAATTGGAAG AGTTTGTTCA AGGGAACCTT	180
GAGAGAGAAT GTATGGAAGA AAAGTGTAGT TTTGAAGAAG CACGAGAAGT TTTTGAAAAC	240
ACTGAAAGAA CAACTGAATT TTGGAAGCAG TATGTTGATG GAGATCAGTG TGAGTCCAAT	300
CCATGTTTAA ATGGCGGCAG TTGCAAGGAT GACATTAATT CCTATGAATG TTGGTGTCCC	360
TTTGGATTTG AAGGAAAGAA CTGTGAATTA GATGTAACAT GTAACATTAA GAATGGCAGA	420
TGCGAGCAGT TTTGTAAAAA TAGTGCTGAT AACAAGGTGG TTTGCTCCTG TACTGAGGGA	480
TATCGACTTG CAGAAAACCA GAAGTCCTGT GAACCAGCAG TGCCATTTCC ATGTGGAAGA	540
GTTTCTGTTT CACAACTTC TAAGCTCACC CGTGCTGAGA CTGTTTTTCC TGATGTGGAC	600
TATGTAAATT CTA CTGAAGC TGAAACCATT TTGGATAACA TCACTCAAAG CACCCAATCA	660
TTTAATGACT TCACTCGGGT TGTTGGTGGA GAAGATGCCA AACCAGGTCA ATTCCCTTGG	720
CAGGTTGTTT TGAATGGTAA AGTTGATGCA TTCTGTGGAG GCTCTATCGT TAATGAAAAA	780
TGGATTGTAA CTGCTGCCCA CTGTGTTGAA ACTGGTGTTA AAATTACAGT TGTCGCAGGT	840
GAACATAATA TTGAGGAGAC AGAACATACA GAGCAAAAGC GAAATGTGAT TCGAATTATT	900
CCTCACCACA ACTACAATGC AGCTATTAAT AAGTACAACC ATGACATTGC CCTTCTGGAA	960
CTGGACGAAC CCTTAGTGCT AAACAGCTAC GTTACACCTA TTTGCATTGC TGACAAGGAA	1020
TACACGAACA TCTTCCTCAA ATTTGGATCT GGCTATGTAA GTGGCTGGGG AAGAGTCTTC	1080
CACAAAGGGA GATCAGCTTT AGTTCTTCAG TACCTTAGAG TTCCACTTGT TGACCGAGCC	1140
ACATGTCTTC GATCTACAAA GTTCACCATC TATAACAACA TGTTCTGTGC TGGCTTCCAT	1200

- 37 -

GAAGGAGGTA GAGATTCATG TCAAGGAGAT AGTGGGGGAC CCCATGTTAC TGAAGTGGAA 1260  
GGGACCAAGTT TCTTAACTGG AATTATTAGC TGGGGTGAAG AGTGTGCAAT GAAAGGCCAAA 1320  
TATGGAATAT ATACCAAGGT ATCCCGGTAT GTCAACTGGA TTAAGGAAAA AACAAAGCTC 1380  
ACTTAATGA 1389

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren  
(B) ART: Aminosäure  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

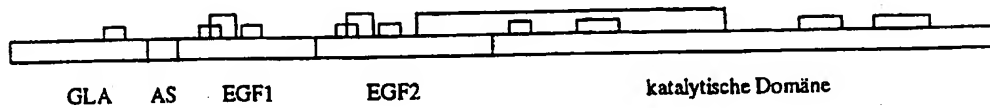
Met His His His His Asp Asp Asp Asp Lys  
1 5 10

### Patentansprüche

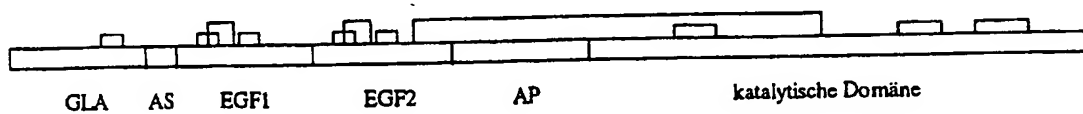
1. Nicht glycosyliertes enzymatisch aktives Protein mit Serinproteaseaktivität und dessen zymogene Form bestehend aus den folgenden Domänen einer Protease der Faktor IX Familie:
  - a) der katalytischen Domäne, N-terminal verbunden mit
  - b) einer Zymogen-Aktivierungsdomäne, N-terminal verbunden mit
  - c) einer EGF1 und/oder EGF2 Domäne.
2. Verfahren zur Herstellung eines Proteins und dessen zymogener Form gemäß Anspruch 1 durch heterologe Expression einer Nukleinsäure, welche für das genannte Protein codiert, in einem prokaryontischen Organismus durch Transformation des Organismus mit einem Expressionsvektor, der ein rekombinantes Gen enthält, welches für die genannte Protease codiert, Expression des Gens und Isolierung der so hergestellten Protease.
3. Verwendung des Proteins und dessen zymogene Form gemäß Anspruch 1 zur Identifikation von Aktivatoren und/oder Inhibitoren einer Protease aus der Faktor IX Familie.
4. Verfahren zur Bestimmung von Faktor IXa in wäßrigen Lösungen, vorzugsweise in Körperflüssigkeiten, durch Inkubation mit einem Zymogen gemäß Anspruch 1 und einem chromogenen Peptidsubstrat, wobei die Spaltung des Peptidsubstrats spezifisch durch das aktivierte Zymogen erfolgt.



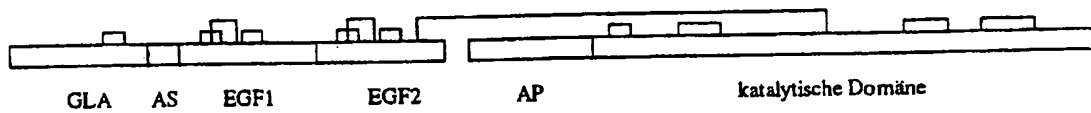
## Faktor VII



## Faktor IX



## Faktor X



## Protein C

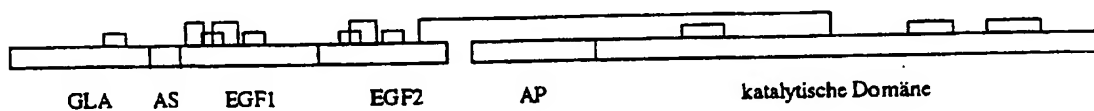
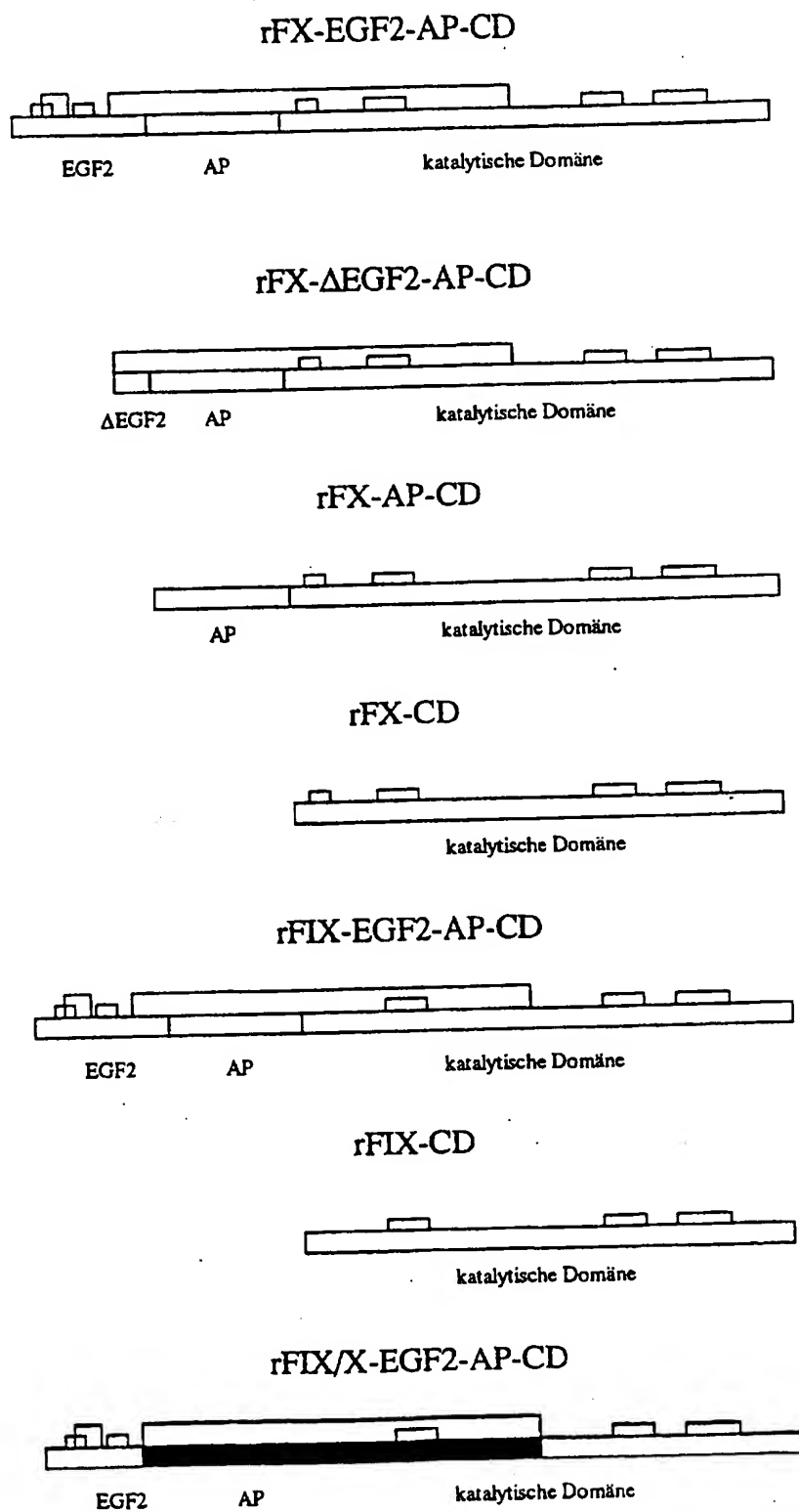


Fig. 2



CTG CTC GGG GAA AGT CTG TTC ATC CGC AGG GAG CAG GCC AAC AAC ATC	48
Leu Leu Gly Glu Ser Leu Phe Ile Arg Arg Glu Gln Ala Asn Asn Ile	16
CTG GCG AGG GTC ACG AGG GCC AAT TCC TTT CTT GAA GAG ATG AAG AAA	96
Leu Ala Arg Val Thr Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys	32
GGA CAC CTC GAA AGA GAG TGC ATG GAA GAG ACC TGC TCA TAC GAA GAG	144
Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Thr Cys Ser Tyr Glu Glu	48
GCC CGC GAG GTC TTT GAG GAC AGC GAC AAG ACG AAT GAA TTC TGG AAT	192
Ala Arg Glu Val Phe Glu Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn	64
AAA TAC AAA GAT GGC GAC CAG TGT GAG ACC AGT CCT TGC CAG AAC CAG	240
Lys Tyr Lys Asp Gly Asp Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln	80
GGC AAA TGT AAA GAC GGC CTC GGG GAA TAC ACC TGC ACC TGT TTA GAA	288
Gly Lys Cys Lys Asp Gly Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu	96
GGA TTC GAA GGC AAA AAC TGT GAA TTA TTC ACA CGG AAG CTC TGC AGC	336
Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser	112
108 FX-EGF2 ->	
CTG GAC AAC GGG GAC TGT GAC CAG TTC TGC CAC GAG GAA CAG AAC TCT	384
Leu Asp Asn Gly Asp Cys Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser	128
GTG GTG TGC TCC TGC GCC CGC GGG TAC ACC CTG GCT GAC AAC GGC AAG	432
Val Val Cys Ser Cys Ala Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys	144
GCC TGC ATT CCC ACA GGG CCC TAC CCC TGT GGG AAA CAG ACC CTG GAA	480
Ala Cys Ile Pro Thr Gly Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu	160
154 FX-DEGF2 ->	
CGC AGG AAG AGG TCA GTG GCC CAG GCC ACC AGC AGC AGC GGG GAG GCC	528
Arg Arg Lys Arg Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala	176
166 FX-AP ->	
CCT GAC AGC ATC ACA TGG AAG CCA TAT GAT GCA GCC GAC CTG GAC CCC	576
Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro	192
ACC GAG AAC CCC TTC GAC CTG CTT GAC TTC AAC CAG ACG CAG CCT GAG	624
Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu	208
AGG GGC GAC AAC AAC CTC ACC AGG ATC GTG GGA GGC CAG GAA TGC AAG	672
Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys	224
217 FX-CD ->	
GAC GGG GAG TGT CCC TGG CAG GCC CTG CTC ATC AAT GAG GAA AAC GAG	720
Asp Gly Glu Cys Pro Trp Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu	240
GGT TTC TGT GGT GGA ACC ATT CTG AGC GAG TTC TAC ATC CTA ACG GCA	768
Gly Phe Cys Gly Gly Thr Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala	256
GCC CAC TGT CTC TAC CAA GCC AAG AGA TTC GAA GGG GAC CGG AAC ACG	816
Ala His Cys Leu Tyr Gln Ala Lys Arg Phe Glu Gly Asp Arg Asn Thr	272
GAG CAG GAG GAG GGC GGT GAG GCG GTG CAC GAG GTG GAG GTG GTC ATC	864
Glu Gln Glu Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile	288
AAG CAC AAC CGG TTC ACA AAG GAG ACC TAT GAC TTC GAC ATC GCC GTG	912
Lys His Asn Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val	304

CTC CGG CTC AAG ACC CCC ATC ACC TTC CGC ATG AAC GTG GCG CCT GCC	960
Leu Arg Leu Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala	320
TGC CTC CCC GAG CGT GAC TGG GCC GAG TCC ACG CTG ATG ACG CAG AAG	1008
Cys Leu Pro Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys	336
ACG GGG ATT GTG AGC GGC TTC GGG CGC ACC CAC GAG AAG GGC CGG CAG	1056
Thr Gly Ile Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln	353
TCC ACC AGG CTC AAG ATG CTG GAG GTG CCC TAC GTG GAC CGC AAC AGC	1104
Ser Thr Arg Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser	368
TGC AAG CTG TCC AGC AGC TTC ATC ATC ACC CAG AAC ATG TTC TGT GCC	1152
Cys Lys Leu Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala	384
GGC TAC GAC ACC AAG CAG GAG GAT GCC TGC CAG GGG GAC AGC GGG GGC	1200
Gly Tyr Asp Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly	400
CCG CAC GTC ACC CGC TTC AAG GAC ACC TAC TTC GTG ACA GGC ATC GTC	1248
Pro His Val Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val	416
AGC TGG GGA GAG GGC TGT GCC CGT AAG GGG AAG TAC GGG ATC TAC ACC	1296
Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr	432
AAG GTC ACC GCC TTC CTC AAG TGG ATC GAC AGG TCC ATG AAA ACC AGG	1344
Lys Val Thr Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg	448
GGC TTG CCC AAG GCC AAG AGC CAT GCC CCG GAG GTC ATA ACG TCC TCT	1392
Gly Leu Pro Lys Ala <u>Lys</u> Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser	464
	<- 454
CCA TTA AAG TGA	1404
Pro Leu Lys End	467

ATG CAG CGC GTG AAC ATG ATC ATG GCA GAA TCA CCA GGC CTC ATC ACC	
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr	
ATC TGC CTT TTA GGA TAT CTA CTC AGT GCT GAA TGT ACA GTT TTT CTT	
Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu	
GAT CAT GAA AAC GCC AAC AAA ATT CTG AAT CGG CCA AAG AGG TAT AAT	6
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn	2
TCA GGT AAA TTG GAA GAG TTT GTT CAA GGG AAC CTT GAG AGA GAA TGT	54
Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys	18
ATG GAA GAA AAG TGT AGT TTT GAA GAA GCA CGA GAA GTT TTT GAA AAC	102
Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn	34
ACT GAA AGA ACA ACT GAA TTT TGG AAG CAG TAT GTT GAT GGA GAT CAG	150
Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln	50
TGT GAG TCC AAT CCA TGT TTA AAT GGC GGC AGT TGC AAG GAT GAC ATT	198
Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile	66
AAT TCC TAT GAA TGT TGG TGT CCC TTT GGA TTT GAA GGA AAG AAC TGT	246
Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys	82
GAA TTA GAT GTA ACA TGT AAC ATT AAG AAT GGC AGA TGC GAG CAG TTT	294
Glu Leu <u>Asp</u> Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe	98
185 FIX-EGF2 ->	
TGT AAA AAT AGT GCT GAT AAC AAG GTG GTT TGC TCC TGT ACT GAG GGA	342
Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly	114
TAT CGA CTT GCA GAA AAC CAG AAG TCC TGT GAA CCA GCA GTG CCA TTT	390
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe	130
CCA TGT GGA AGA GTT TCT GTT TCA CAA ACT TCT AAG CTC ACC CGT GCT	438
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala	146
GAG ACT GTT TTT CCT GAT GTG GAC TAT GTA AAT TCT ACT GAA GCT GAA	486
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu	162
ACC ATT TTG GAT AAC ATC ACT CAA AGC ACC CAA TCA TTT AAT GAC TTC	534
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe	178
ACT CGG GTT GTT GGT GGA GAA GAT GCC AAA CCA GGT CAA TTC CCT TGG	582
Thr Arg <u>Val</u> Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp	194
181 FIX-CD ->	
CAG GTT GTT TTG AAT GGT AAA GTT GAT GCA TTC TGT GGA GGC TCT ATC	630
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile	210
GTT AAT GAA AAA TGG ATT GTA ACT GCT GCC CAC TGT GTT GAA ACT GGT	678
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly	226
GTT AAA ATT ACA GTT GTC GCA GGT GAA CAT AAT ATT GAG GAG ACA GAA	726
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu	242
CAT ACA GAG CAA AAG CGA AAT GTG ATT CGA ATT ATT CCT CAC CAC AAC	774
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn	258

6/6

Fig. 4

TAC AAT GCA GCT ATT AAT AAG TAC AAC CAT GAC ATT GCC CTT CTG GAA	822
Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu	274
CTG GAC GAA CCC TTA GTG CTA AAC AGC TAC GTT ACA CCT ATT TGC ATT	870
Leu Asp Glu <u>Pro</u> Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile	290
278	
GCT GAC AAG GAA TAC ACG AAC ATC TTC CTC AAA TTT GGA TCT GGC TAT	918
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr	306
GTA AGT GGC TGG GGA AGA GTC TTC CAC AAA GGG AGA TCA GCT TTA GTT	966
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val	322
CTT CAG TAC CTT AGA GTT CCA CTT GTT GAC CGA GCC ACA TGT CTT CGA	1014
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg	338
TCT ACA AAG TTC ACC ATC TAT AAC AAC ATG TTC TGT GCT GGC TTC CAT	1062
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His	354
GAA GGA GGT AGA GAT TCA TGT CAA GGA GAT AGT GGG GGA CCC CAT GTT	1110
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val	370
ACT GAA GTG GAA GGG ACC AGT TTC TTA ACT GGA ATT ATT AGC TGG GGT	1158
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly	386
GAA GAG TGT GCA ATG AAA GGC AAA TAT GGA ATA TAT ACC AAG GTA TCC	1206
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser	402
CGG TAT GTC AAC TGG ATT AAG GAA AAA ACA AAG CTC ACT TAA TGA	1251
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr End End	415
<- 1245	

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 97/03027

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 C12N9/64 C07K14/745

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PROTEIN ENGINEERING, vol. 7, no. 9, 1994, pages 1121-1127, XP000605412 P.E. HUGUES ET AL.: "Protein engineering of the hydrophobic domain of human factor IX" * see the whole article *	
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 24, 1989, pages 14298-14304, XP000051837 H.J. EHRLICH ET AL.: "Direct expression of recombinant activated human protein C, a serum protease" * see the whole article *	

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \* "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \* "E" earlier document but published on or after the international filing date
- \* "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \* "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \* "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\* "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\* "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\* "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\* "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 August 1997

Date of mailing of the international search report

10.09.97

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Marie, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.

PCT/EP 97/03027

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION,  vol. 80, no. 4, 1987,  pages 1023-1028, XP000605756  B.G. SCHACH ET AL.: "Hemophilia B due to  a single nucleotide deletion in the gene  for Factor IX"  * see the whole article *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen  
PCT/EP 97/03027

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N9/64 C07K14/745

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	PROTEIN ENGINEERING, Bd. 7, Nr. 9, 1994, Seiten 1121-1127, XP000605412 P.E. HUGUES ET AL.: "Protein engineering of the hydrophobic domain of human factor IX" *siehe den gesamten Artikel*	
A	JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Bd. 264, Nr. 24, 1989, Seiten 14298-14304, XP000051837 H.J. EHRLICH ET AL.: "Direct expression of recombinant activated human protein C, a serum protease" *siehe den gesamten Artikel*	

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☐ Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

27. August 1997

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

10. 08. 97

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Marie, A

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 97/03027

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION,            Bd. 80, Nr. 4, 1987,            Seiten 1023-1028, XP000605756            B.G. SCHACH ET AL.: "Hemophilia B due to            a single nucleotide deletion in the gene            for Factor IX"            *siehe den gesamten Artikel*</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	